

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 8 日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/003551 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/53, C12Q 1/68, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008196

(22) 国際出願日: 2003 年 6 月 27 日 (27.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-191224 2002 年 6 月 28 日 (28.06.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キヤノン株式会社 (CANON KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP];
〒146-8501 東京都大田区下丸子3-30-2 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高田 一広

(TAKADA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒146-8501 東京都大田区下丸子3-30-2 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 岡部 正夫, 外 (OKABE, Masao et al.); 〒100-0005 東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 富士ビル602号室 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

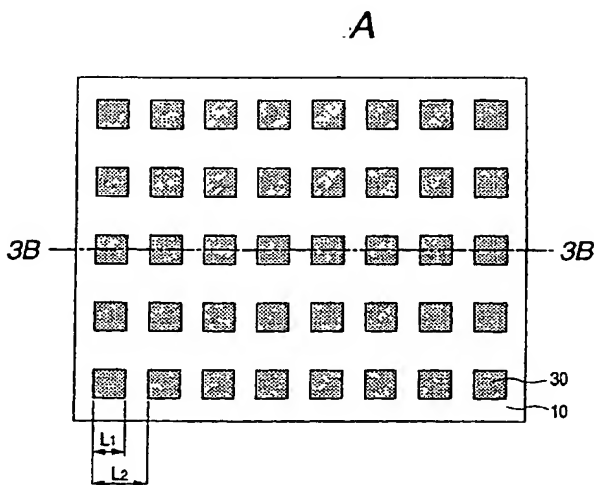
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

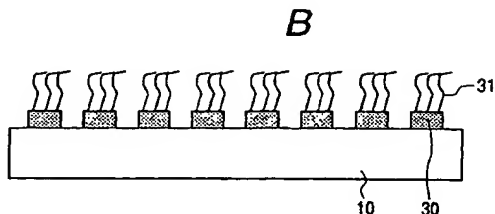
(54) Title: PROBE SUPPORT, METHOD OF CONSTRUCTING PROBE SUPPORT, METHOD OF EVALUATING PROBE SUPPORT AND METHOD OF DETECTING TARGET NUCLEIC ACID USING THE SAME

(54) 発明の名称: プローブ担体、プローブ担体の作成方法及びプローブ担体の評価方法及びそれを用いた標的核酸の検出方法



(57) Abstract: It is intended to provide a probe support whereby a single-stranded probe DNA can be immobilized on the support and the form of a dot or a spot, etc. of the probe, which has been thus immobilized on the support, can be accurately observed with the use of a scanning probe microscope or techniques derived therefrom. A gold-containing film is formed in a region of a support, in which a single-stranded DNA probe is to be immobilized, and then the single-stranded DNA probe is immobilized to the film via a sulfur atom.

(57) 要約: 効果的に一本鎖DNAプローブを担体に固定化でき、かつ走査型プローブ顕微鏡及びその派生技術の手法を用いて正確に担体上に固定されたプローブのドットやスポットの形状等を観察し得る構造を有するプローブ担体を提供すること。担体の一本鎖DNAプローブが固定される領域に金を含む膜を形成し、この膜に硫黄原子を介して一本鎖DNAプローブを固定する。



1

明 細 書

プローブ担体、プローブ担体の作成方法及びプローブ担体の
評価方法及びそれを用いた標的核酸の検出方法

5

技術分野

本発明は金を含有する膜に一本鎖 DNA プローブを固定化したプローブ担体、その製造方法、その評価方法及びこのプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法に関する。

10

背景技術

核酸の塩基配列の決定、サンプル中の標的核酸の検出、および各種細菌の同定を迅速、正確に行ない得る技術の一つとして、例えば該標的核酸と特異的に結合し得る物質、いわゆるプローブを固相上に多数並べたプローブアレイの使用が提案されている。このようなプローブアレイの一般的な製造方法としては、
15 例えば

- (1) 固相上で核酸プローブを合成していく方法、および
- (2) 予め合成した核酸プローブを固相上に供給する方法等が知られている。

上記(1)の方法の詳細が開示されている先行技術としては例えば米国特許
20 第5405783号明細書が挙げられる。

また、上記(2)の方法が開示されている先行技術としては、例えば米国特許第5601980号明細書および「サイエンス (Science)」、第270巻、467頁、(1995)があり、それらにはマイクロピペティングを用いてcDNAをアレイ状に並べる方法が開示されている。

25

上記(1)の方法では、固相上で直接核酸プローブを合成させている為、予め核酸プローブを合成する必要がない。しかし固相上で合成されたプローブ核

酸を精製することは困難である。プローブアレイを用いた核酸塩基の配列決定や、サンプル中の標的核酸の検出等の精度は、核酸プローブの塩基配列の精度に大きく依存する。従って上記（１）の方法は、より高品質なプローブアレイの製法としては核酸プローブの精度の向上に更なる改良が求められるところである。

一方、上記（２）の方法は、核酸プローブの固相への固定に先立って核酸プローブの合成ステップが必要となる反面、固相への結合に先立って核酸プローブを精製することができる。この理由により現段階においては、より高品質なプローブアレイの製法としては上記（２）の方法は、上記（１）の方法よりも好ましいと考えられる。

しかし上記（２）の方法においては、核酸プローブを固相に高密度にスポットティングする必要があるという課題がある。例えばプローブアレイを用いて核酸の塩基配列決定を行なう場合、できる限り多種の核酸プローブを固相上に配置しておくことが好ましい。また遺伝子の変異の検出を効率的に行なう場合には、それぞれの変異に対応した配列を有する核酸プローブを固相上に配置しておくことが好ましい。さらに、サンプル中の標的核酸の検出や、遺伝子の変異、欠損の検出に当たっては、被験者からのサンプルの採取、具体的には血液等の採取はできる限り少量に止めておくことが好ましく、よって少量の検体でできる限り多くの塩基配列の情報を獲得できることが好ましい。

上記（２）の手法で核酸プローブを固定する基板表面には、プローブと強固に結合するための機能と平滑性が望まれる。従来からよく用いられている材料としては、ガラス、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、その混合物等）、金属（例えば、金、プラチナ等）が含まれる。通常はこれら基板表面上に直接プローブを固定するためには化学結合を利用するために、プローブと基板表面との結合部位の官能基は、反応性が高いものを組合わせたものから選択される。そのため基板表面にプローブとの結合

を行う結合層を設ける必要がある。大抵の場合において、結合層として厚さが単分子厚～約 1 nm の範囲のものを、単層あるいは複数層として設けることでプローブと基板を強固に固定することが行われる。

また、基板上に形成されたプローブ自体はナノメートルオーダーの構造を有するものであるために、それ自体を観察あるいは評価しようとした場合、しばしば走査型プローブ顕微鏡が用いられることが多かった。ここで記述する走査型プローブ顕微鏡とは、微細な針を試料表面に近づけることで、原子レベルでの観察が可能な走査型顕微鏡の総称を意味し、走査型トンネル顕微鏡（STM: Scanning Tunneling Microscopy）や原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscopy）およびこれらの技術を基盤として派生してきた顕微鏡の観察手法等を意味する。走査型プローブ顕微鏡による DNA の観察に関しては、既に報告されているものが多数あるが、金属基板を超高真空中で処理して、そこに DNA を形成させるといふ、いわば観察に適した状態で試料を作成することが必須であった。

15

発明の開示

しかしながら、上記従来のプローブを形成する手法では、基板処理以外に、プローブと基板を強固に結合させるための結合層を基板上に形成するために、結合層の作成工程が必要であり、プローブを作成するための手間と時間を要した。また、通常このようにして形成されたプローブの表面を走査型プローブ顕微鏡等で観察を行う際に、結合層の凹凸が反映されるために、ナノメートルオーダーのプローブ自体の形状観察を行うには適当ではなかった。

20

そこで本発明は上述の問題点を解消するためになされたものであって、本発明の目的は、作成工程が容易で平滑な面を有する担体を作成すると共に、該担体に結合層等を形成することなく、極めて微量の一本鎖 DNA プローブを該プローブに損傷を与えることなく、かつ効率的に正確に固定化する方法を提供する

25

ことである。

本発明の他の目的は、少量の検体からでも DNA に関するより多くの情報をより正確に検査可能なプローブアレイなどのプローブ担体を提供することである。

- 5 本発明の他の目的は、担体上のプローブアレイを走査型プローブ顕微鏡及びその派生技術の手法を用いて正確にその形状等を観察及び検査できる構造のプローブ担体を提供することである。

本発明は、上述した課題を解決するために鋭意検討を行って成されたものであり、以下に述べる構成のものである。

- 10 すなわち、本発明にかかるプローブ担体は、金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖 DNA プローブが固定されていることを特徴とするプローブ担体である。

- 本発明にかかるプローブ担体の作成方法は、金を含有する膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖 DNA プローブが固定されているプローブ担体の製造方法であって、
- 15

担体上に金を含有する膜を形成する工程と、

該膜に一本鎖 DNA プローブを硫黄原子を介して固定化する工程とを有することを特徴とするプローブ担体の作成方法である。

- また、本発明にかかるプローブ担体の評価方法は、上記の方法で作成された
- 20 プローブ担体の形状を走査型プローブ顕微鏡で観察及び検査することを特徴とするプローブ担体の評価方法である。

- 本発明にかかる標的核酸の検出方法は、標的核酸の検出のための一本鎖 DNA プローブを有するプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法において、該プローブ担体が、上記構成のプローブ担体であることを特徴とする標的核酸の検出
- 25 方法である。

本発明によれば、平滑面を形成できる金を含有する膜上に官能基としてチオ

ール基を有する一本鎖 DNA プローブを固定化するので、金とチオール基との結合により硫黄原子を介した強固な結合が形成され、担体に強固に結合した一本鎖 DNA プローブを有するプローブ担体を提供することができる。また、本発明で使用している金を含有する膜は極めて平坦性が高く、大気中でも酸化されにくく、非常に安定であるため、走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で直接プローブの評価をすることが可能となった。

また、本発明は、上記の金を含有した膜を電圧が印加可能に構成されている電極として用いることによって、前記電極を介した電気化学的な測定により、ハイブリッド体（二本鎖核酸）の検出を行なう方法や前記電極間に DNA を介して作成した分子デバイス等をも提供する。

図面の簡単な説明

図 1 は、金結晶薄膜形成装置の概略図である。

図 2 は、パターニング基板の作成を実施するための装置の概略構成図である。

図 3 A は、金がパターニングされた基板の概略平面図であり、図 3 B は、図 3 A に DNA がスポッティングされた後の 3 B - 3 B 断面図である。

図 4 は、実施例 3 で説明する電子ビームを用いたパターニング装置の概略図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明において担体上に固定されたプローブは、特定の標的物質に対して特異的に結合可能なものであり、標的核酸の有する塩基配列と相補的な配列をプローブが有することで、これらのハイブリッド体を形成し得るものである。

この担体としては、各種形状及び材料からなり、金を含有する膜の形成が可能であるものから選択することができ、例えばガラス基板などが好適に利用できる。

プローブを構成する核酸としては、一本鎖 DNA が利用され、これは合成されたもの、ゲノム DNA や cDNA として取得したものから所望のプローブ機能を有する部分を取り出したものなどを利用することができる。

5 担体上への一本鎖 DNA プローブの固定化は後述するとおり金を含有する膜とチオール基との反応により行われる。その際、これらの結合部がハイブリダイゼーションに影響を与えないように結合部の配置を考慮することが好ましい。

本発明においては、ドットやスポットなどの形状でプローブが固定されたプローブ固定領域を担体上に有するものをプローブ担体といい、複数のプローブ固定領域のそれぞれを互いに独立させて担体上の所定位置に、マトリックス状などの配置で配列したものをプローブアレイという。なお、このプローブ担体には、通常、マイクロアレイ、DNA チップ等の核酸チップなどといわれているものも含まれる。

本発明においては、各プローブ固定領域の大きさは、 $5\mu\text{m}^2 \sim 500\mu\text{m}^2$ 、好ましくは $10 \sim 200\mu\text{m}$ であるとよい。

15 金を含有する膜としては、111 方位の単結晶薄膜が好ましく、金単結晶薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で 0.5nm 以下、膜厚は $5\mu\text{m}$ 以下であることが更に好ましい。また、担体と一本鎖 DNA プローブを介する硫黄原子は、一本鎖 DNA プローブの官能基として導入されたものであることが好ましい。また、金を含有する膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、担体上に金の単結晶薄膜を形成する方法を好適に用いることができる。

以下、図を参照しつつ本発明の好ましい一態様について説明する。

図 1 は、担体としての基板に選択的に金単結晶を堆積させる金結晶薄膜形成装置の概略図である。同図において、12 は溶液槽、14 は溶液、13 は溶液の温度を測定する熱電対等の温度測定素子、15 は溶液 14 を加熱するためのヒータ、11 は電源であり熱電対 13 により得られた温度の信号をもとにヒータ 15 に印加する電圧を制御し、溶液の温度を一定に保つための機構を有する。

上記の装置を用いて本発明のDNAチップの形成法について以下に説明する。まず基板の作成工程について説明する。

はじめに基板上に金の薄膜の形成を行う。基板としては種々のガラスや金属、シリコン等を用いることができる。まず溶液槽12に蒸留水を入れヨウ化カリウム及びヨウ素を投入してヨウ素水溶液を形成した後、金を投入し攪拌溶解させ、溶液14として $[\text{AuI}_4]^-$ を含有する金錯体溶液を形成する。このとき溶液中には、金錯体 $[\text{AuI}_4]^-$ の他、 I_3^- 、 K^+ が存在するものと考えられる。

ヨウ素水溶液は、ヨウ化カリウム以外のヨウ化化合物、例えばヨウ化アンモニウムを溶解することでも作成出来る。また、アルコールを溶媒として用いたヨウ素アルコール溶液やアルコールと水の混合物を溶媒として用いたヨウ素アルコール・水溶液も本発明に用いることができる。溶液中のヨウ素、ヨウ化化合物の濃度は、溶解することのできる金の量を左右する。

次いで、前記基板10の表面を溶液に接した後、ヒータ15によって溶液14を加熱し溶液14を30～100℃の所望の温度に昇温し、一定の温度になる様に電源11で制御し、ヨウ素成分の揮発を促進させる。

溶液14系内では、 I_3^- の状態で存在するヨウ素成分の揮発による、溶液系内の平衡状態の維持の為に $[\text{AuI}_4]^-$ からのI成分の解離による分解、又は $[\text{AuI}_4]^-$ の形で存在する錯体中のヨウ素成分の直接の揮発による分解が進行すると考えられ、結果として金が過飽和状態となる。

溶液14中で過飽和状態となった金は、基板表面にランダムな核として析出し、その後核が自己整合的に成長し単結晶膜が形成される。

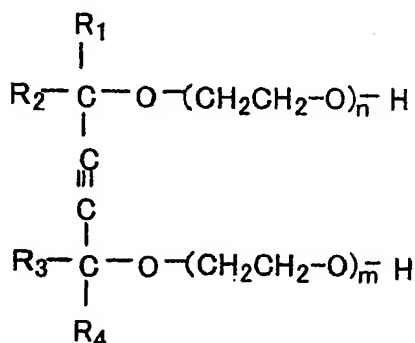
作成された金単結晶膜のX線回折測定を行ったところ、欠陥のない単結晶であり、111方位を有していることがわかった。

次に、ここまでで形成された基板上に一本鎖DNAプローブの形成を行う。初めにチオール基が結合したDNAプローブの合成を行う。例えばDNA自動合成機を用いてDNAを自動合成する際に5'末端の試薬として5'-Thiol-ModifierC6

(Glen Research 社製) を用いることにより合成することができ、通常の脱保護反応の後、高速液体クロマトグラフィーにより精製することで得られる。DNA プローブの金基板へのスポットティングは、インクジェット技術を用いて吐出させて形成する。

- 5 スポットティング用液体の組成物は、液体のインクジェット吐出特性、及び液体中及びバブルジェット吐出時の DNA プローブの安定性を考慮して適当な濃度で含有させることが好ましい。

10 バブルジェットヘッドから吐出される液体の組成としては、上記した様に DNA プローブと混合したとき、及びバブルジェットヘッドから吐出させたときに DNA プローブに対して影響を実質的に与えないものであって、且つバブルジェットヘッドを用いて固相に対して正常に吐出可能である液体組成が好ましい条件を満たせば、特に限定されるものでない。例えばグリセリン、尿素、エチレングリコール、イソプロピルアルコール及び下記式 (I) で示されるアセチレンアルコールを含む液体が好ましい。



15

式 (I)

(上記式 (I) 中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 はアルキル基、具体的には例えば炭素数 1~4 の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基を表わし、 m 及び n は各々整数を表わし、 $m=0$ 且つ $n=0$ であるか、 $1 \leq m+n \leq 30$ であるか、あるいは $m+n=1$ の場合に m または n は 0 である。)

20

更に具体的には尿素を 5~10 wt %、グリセリンを 5~10 wt %、エチ

レングリコールを 5～10 wt %、及び上記式 (I) で示されるアセチレンアルコールを 0.02～5 wt %、より好ましくは 0.5～1 wt % を含む液体が好適に用いられる。

- この液体を用いた場合、バブルジェットヘッドから核酸プローブを含む液体を吐出させて固相上に付着させたときは、液体に含有されているチオール基と金薄膜が選択的に結合する。金とチオールとの反応は以下の式で起こると考えられている。



- 上記選択的反応により、一本鎖 DNA プローブは、基板上に形成された金の上のみ選択的に結合されプローブ担体が形成される。

- この様にして作成するプローブアレイはその用途に応じて、例えば同じ DNA プローブを含む複数のスポットを有するように構成してもよく、また異種の DNA プローブを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。そしてこの様な方法によって DNA プローブが高密度に配置されたプローブアレイは、その後標的一本鎖 DNA の検出や、塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的一本鎖 DNA の検出に用いる場合には、該標的一本鎖 DNA の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA をプローブとして用い、該プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブアレイを用意し、該プローブアレイの各々のスポットに、サンプルを供給して該標的一本鎖 DNA と DNA プローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。それによってサンプル中の標的物質の有無の検出を行なうことができる。またサンプル中に含まれている標的一本鎖 DNA の塩基配列の特定に用いる場合には、該標的一本鎖 DNA の塩基配列の複数の候補を設定し、該塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する

- 一本鎖 DNA をプローブとして該固相にスポッティングする。次いで各々のスポットにサンプルを供給して該標的一本鎖 DNA と DNA プローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより標的一本鎖 DNA の塩基配列の特定を行なうことができる。

- これまでの手順で、一本鎖 DNA プローブを基板上に形成する方法を説明したが、本基板の特徴として、一本鎖 DNA プローブが結合している金の表面の平滑性が非常に高いという点が挙げられる。加えて、金であるために、酸化されにくく大気中に放置しても安定に平滑な表面を維持しているという特徴を有している。この特徴を利用して、例えば一本鎖 DNA プローブの形態を直接走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で観察することが可能となる。また、基板として絶縁性材料からなる DNA チップの場合には、原子間力顕微鏡でしか観察することができなかったが、本 DNA チップの基板は導電性を有するために、トンネル電流をモニターする、STM での観察も可能である。

- また、本発明に係るプローブ担体は、形成された金を含有する膜を電極として用いることによって、金と結合した DNA プローブと標的一本鎖 DNA とのハイブリタイゼーション反応を電気化学的に検出することも可能である。

以下、電極として用いた遺伝子検出法については、後に詳細に説明する。

- 更には形成された金を含有する膜を電極として用い、両端をチオール化した DNA を電極間にスポッティングすることで分子デバイス等も提供することが可能である。

- 次に、金をパターニングして DNA チップを形成する方法について説明する。図 2 は、パターニング基板の作成を実施するための装置の概略構成図である。金を含む膜のパターニングには、電子線やイオンを照射して金の薄膜の形成が可能な領域と、そうでない領域とからなる潜像を形成してそれを利用する方法が好適である。

同図において、20は試料保持台、21は真真空気密可能な潜像室、22は基板に潜像層を形成するのに必要な反応処理ガスを導入するためのガス導入口、24は基板10を潜像室21に導出入するための真真空気密可能なゲートバルブ、25は潜像室21内を真空排気可能で排気速度が制御可能な真空排気装置、
5 26はエネルギービーム発生源である光源、但しここではKrFエキシマレーザーを用い、28は所望のパターンを持つマスク27をエキシマレーザー光で照射するための照明光学系、29はマスクの像を基板10表面に結像するための投影光学系、23はエキシマレーザー光を透過しかつ真真空気密可能な光入射窓、ここでは材質として熔融石英を用いた。

- 10 金をパターンニングした基板を作成するために、まずゲートバルブ24を開け、例えばシリコン等の基板10を試料保持台20に載せ、ゲートバルブ24を閉じ真空排気装置25によって潜像室21内の圧力が 10^{-7} Torr 以下になるまで真空排気する。ガス導入口22より O_2 等の潜像用ガスを潜像室21内に導入し内部の圧力が0.1Torr～760Torrの範囲で、所定の圧力になる様に真空排気装置25の排気速度を制御する。次にKrFエキシマレーザー26で発振させた波
15 長248nmのレーザー光を照明光学系28によって所望のパターンを有するマスク27に均一に照射し、投影光学系29によって基板10にマスク27のパターン像を光入射窓23を通して結像させる。マスク像が結像した基板表面では、光が当たった部分のみで潜像用ガスとSi基板が光化学反応を起こし潜像層が
20 形成される。潜像ガスとして O_2 を用いているので潜像層の組成は酸化シリコンとなる。所望の厚さ(2～10nm)に潜像層が形成された後、ガスの供給を止め、潜像室21内の圧力が 10^{-7} Torr 以下になるまで真空排気する。ゲートバルブ24を開いて基板20を取り出す。ここでは光源として、KrFエキシマレーザーを用いたが、試料表面で光化学反応を起こす波長であれば特に限定されず、キ
25 セノンランプ、高圧水銀灯等のランプ光源や、ArFエキシマレーザー、XeClエキシマレーザー、Arレーザー等の光源も使用可能である。なお光入射窓23の

材質として波長 248nm のレーザー光を吸収せずに透過させるため熔融石英を使用した。この他、 CaF_2 、 MgF_2 、 LiF 、サファイアガラス等も使用可能であり、要するに光源で発光する光を透過し、潜像室の内外の圧力差に耐えられるものであれば特に限定されるものではない。

5 次以前記工程で作成された基板上に金の形成を行う。手法的には既述の方法をそのまま用いればよい。図 1 に示した薄膜形成装置を用い、基板 10 を溶液槽 12 に浸漬する。溶液 14 中で過飽和状態となった金が、潜像層が形成されていない核形成密度の高い基板表面のみにランダムな核として析出し、その後核が自己整合的に成長し単結晶膜が形成される。一方潜像層表面は SiO_2 になっており、 SiO_2 表面は核形成密度が低いため潜像層上には、金単結晶は形成されなかった。

10 Si の露出部分が $40\text{ }\mu\text{m}\phi$ 以上では、複数の核から成長が始まりやがて、結晶どうしが衝突し、粒界が形成され、核形成密度の大きい材料からなる面を覆い、平均粒径約 $80\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 程度の単結晶群からなる金結晶薄膜が選択的に形成出来た。

15 ここまでで基板上にパターニングされた金の薄膜が形成されたので、あとは基板を、例えば二次元的に移動することが可能なステージ等に設置して、金のパターンに合わせてプローブ核酸が形成されるようにチオール基が結合した DNA プローブをインクジェット技術を用いて吐出させて形成すれば DNA チップが作成できる。

さらに、上記の金の薄膜を電極として用いるために、該薄膜に電氣的に接続する配線をさらに形成するとよい。該配線は、公知の技術を用いてよく、たとえば銀ペーストの配線を金薄膜のパターンそれぞれに接続させてもよい。

25 本発明に係る電極を有する DNA チップは、ハイブリダイゼーション反応前および／または反応時に電極表面に電位を印加しておくことによりハイブリダイゼーション反応を促進することができる。

印加する電圧は正電位、あるいは交流電位を印加することが好ましく、連続的に、もしくはパルスのように断続的に印加する。また、印加する電位は、一定電位でも、可変電位でもよいが、好ましくは $-0.2\text{V} \sim +2.0\text{V}$ 、より好ましくは $0 \sim 1.0\text{V}$ 正電位であるとよい。

5 また、本発明は、該電極を用いて、遺伝子検出を行う方法も提示する。

以下に、金を含有した膜を電極として用いた遺伝子検出法について説明する。

担体上に固定化された核酸プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーション反応により担体上に二本鎖核酸が形成される。この二本鎖核酸を検出するには、例えば、挿入剤、二本鎖核酸を認識する生体高分子を作用させる方法や、
10 標的核酸に電気化学的に検出可能な標識を導入させる方法を挙げることができる。

挿入剤と呼ばれる物質としては、例えば、トリス（ビピリジル）コバルト錯体など、分子中にフェニル基等の平板状挿入基を有し、この挿入基が二本鎖核酸の塩基対と塩基対との間に介入することのできる物質を挙げることができる。
15 る。

また、挿入剤の中には電極応答する物質もあり、光学的変化または電気化学的変化の測定によって、二本鎖核酸に結合した挿入剤を検出することができる。

電極を用いて電気化学的変化を検出するため、挿入剤として、上述の挿入剤自身が酸化還元反応に対して可逆的である物質の他に、電気的に可逆な酸化還元反応を起こす物質を中心金属として含有する金属錯体、すなわちメタロインターカレーターを用いることができる。このような挿入剤においては、錯体の中心金属もしくは挿入剤自身の酸化還元電位が核酸の酸化還元電位以上であったり、核酸の酸化還元電位に重なることのないものが望ましい。
20

このような電気化学的に可逆である酸化還元反応を起こす挿入剤を用いることにより、酸化還元電流を繰り返して測定することが可能となる。したがって、
25 電位走査を数回ないし数百回繰り返し、得られた信号の値を積算すること

により信号の増幅を行なうことができ、その結果、より高感度の検出が可能となる。

さらに、アクリジニウム誘導体などの電気化学発光を生じる挿入剤を利用してもよい。電気化学発光によって生じた光学的な信号は、例えば、フォトンカウンタを用いて溶液から直接検出すればよい。

電極反応または光学的な信号の変化は、電極が形成されている表面でしか起こらないことから、未反応のプロープや未反応の挿入剤を除去することなく非常に簡単に検出を行なうこともできる。

なお、本発明において、核酸プロープと一本鎖試料核酸との反応は、一般的に溶液中で行なわれる。その際、上記の挿入剤の存在下で核酸プロープと試料核酸とのハイブリダイズ反応を行なってもよく、また該反応の終了後に挿入剤を添加しても良い。

これとは別に、抗DNA抗体のようなDNA結合タンパク質のような生体高分子の中には二本鎖核酸を認識して特異的に結合する物質が存在する。したがって、このような生体高分子もしくはこの生体高分子を認識する物質に、酵素、蛍光物質、発光物質のような標識物質を結合し、この標識物質に起因する電気化学的もしくは光学的な変化を測定して生体高分子の存在の有無を確認することにより二本鎖核酸を検出することが可能となる。

上記生体高分子を用いて電気化学的变化を検出する場合には、例えば、 NAD^+/NADH サイクルにおける NADH を利用することができる。すなわち、生体高分子に結合した酵素により生成した NADH を電極自体で酸化もしくは還元し、その電気的变化を測定すれば良い。なお、このような電気化学的酸化還元反応に関わる物質は、これらに限定されるものではない。

また、上記の挿入剤等を用いず、核酸プロープ自体に標識された標識剤により検出することも可能である。このような直接もしくは間接的に信号を検出することが可能な物質としては、フェロセン、ピオローゲン等の電極活性物質を

挙げることができる。

二本鎖核酸に結合した挿入剤の電極応答によって、ハイブリダイゼーションしたことが検出できる。

5 電極を用いる本発明においては、ポテンシostat、ファンクションジェネレータ、レコーダからなる測定システムを用いるとよい。

電位を挿入剤の酸化還元電位前後に設定し、酸化還元電流を測定することで検出遺伝子の定量を行なうとよい。

10 また、上記の挿入剤等、本発明に係る金を含有する膜を電極として用いる際における具体的な構成としては、特開平 05-285000 号公報に記載の構成を採用することができる。

実施例

15 以下、具体的な実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではなく、本発明の目的が達成される範囲内での各要素の置換や設計変更がなされたものをも包含する。また、実施例内で用いている符号は、図 1 で記述してある符号と同一である。

実施例 1

初めに図 1 に示した装置を用い、金単結晶薄膜の作成を行った。

20 蒸留水 500ml にヨウ化カリウム 40g 及びヨウ素 6g を投入して攪拌溶解させた。この溶液に金を 3g 投入して攪拌溶解させた。溶解後、この溶液から 100ml の溶液を分取して反応容器に入れ、ここにさらに蒸留水を 500ml 加えて攪拌し結晶成長用溶液 1 4 とし溶液槽 1 2 に入れた。

25 基板 1 0 として Si を用い、この基板を結晶成長用溶液 1 4 に浸漬した。次いでこの溶液を 80℃ に加熱して放置した。1.5 時間後基板を取り出し観察したところ、Si 基板上に 1 1 1 面を有する単結晶群が形成されていた。各単結晶間には粒界が形成されていた。STM で観察した結果、個々の単結晶表面の凹凸は、

1 μm 角内で 0.4nm であった。

次に、DNA プローブとして 5' 末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してチオール基を結合したチミン（以降「T」と記載）からなる 75 量体のオリゴマーを用意した。この 1 本鎖 DNA を 8 μM の濃度でグリセリン 7.5 重量%、
5 尿素 7.5 重量%、エチレングリコール 7.5 重量%、及びアセチレンアルコール（商品名：アセチレノール EH；川崎ファインケミカル（株）社製）1 重量%を含む溶液に入れて溶解した。サーマルジェット法的一种であるバブルジェット法を用いたバブルジェットプリンター B J F - 8 5 0（キヤノン）用のプリンターヘッド B C - 5 0（キヤノン）を数 100 μl の溶液を吐出可能とするべく改造し、このヘッドを上記基板上へ吐出可能となるように改造した吐出描画機に搭載した。このヘッドの改造タンク部に上記 DNA 溶液を数 100 μl 注入してスポッティングした。スポッティング時の吐出量は 4pl/droplet で、スポッティングは基板の中央部に 10mm \times 10mm の範囲に吐出した。スポッティングされたドットの直径は約 50 ミクロンであった。

15 ここまでで作成された DNA チップを Digital Instruments 社製 走査型プローブ顕微鏡を用いてタッピングモード AFM の手法を用いて観察した。チップはシリコン単結晶製プローブ（商品名：D-NCH）を使用した。その結果金の原子ステップ上に DNA が形成されている像を得ることができた。

実施例 2

20 図 2 に示した装置を用い、まず第一の工程を行なった。ゲートバルブ 2 4 を開け Si 基板 1 0 を潜像室 2 1 に導入して試料保持台 2 0 に載せ、ゲートバルブ 2 4 を閉じた。真空排気装置 2 5 によって潜像室 2 1 内の圧力が 1 0⁻⁷Torr 以下になるまで真空排気した。ガス導入口 2 2 より酸素を流量 8 0 0 sccm で潜像室 2 1 内に導入し、かつ真空排気装置 2 5 の排気速度を制御して該内部の圧力を 1 0 Torr に設定した。次に K r F エキシマレーザー光源 2 6 で発振させた
25 波長 248nm のレーザー光を照明光学系 2 7 によって所望のパターンを有するマ

スク 28 に均一に照射し、投影光学系 29 によって基板 10 にマスク 28 のパターン像を結像させ 10 分間照射 (Si 基板 100 表面で照射光強度 100 mW/cm^2) して潜像層を形成した。照射終了後ガスの供給を止め、潜像室 21 内の圧力が 10^{-7} Torr 以下になるまで真空排気した。潜像室 21 に窒素ガスを導入して大気圧に戻しゲートバルブ 24 を開け潜像層を形成した Si 基板を取り出した。

次に、図 1 に示した装置を用い、実施例 1 と同様の方法で Si 基板上に金の薄膜を形成させた。図 3 A には作成されたパターニング基板の概略平面図を示す。作成したパターンは $L_1 = 100 \mu\text{m}$ 、 $L_2 = 500 \mu\text{m}$ となるようにした。

10 DNA プローブとして 5' 末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してチオール基を結合したチミン (以降「T」と記載) からなる 75 量体のオリゴマーを用意した。これを実施例 1 と同様のバブルジェットプリンター吐出用溶液に調整し、この液体をバブルジェットプリンターを用い、前工程で作成された金のパターンが形成された基板を不図示の駆動装置によって二次元的に移動させることによって、図 3 A に示したパターンの間隔で金薄膜上にプローブ核酸が形成されるようにプローブ核酸を含む液体をガラス板上にスポッティングして基板上にプローブアレイを形成させた。

図 3 B は図 3 A の 3 B-3 B 断面図の模式図であり、最終的に作成されたプローブアレイの模式図である。

20 ここまでで作成された DNA チップを Digital Instruments 社製 走査型プローブ顕微鏡を用いてタッピングモード AFM の手法を用いて観察した。チップはシリコン単結晶製プローブ (商品名: D-NCH) を使用した。その結果パターニングされた金の上に金の原子ステップ上に DNA が形成されている像を得ることができた。

25 実施例 3

図 4 に示した電子ビームを用いたパターニング装置を用いた例を説明する。

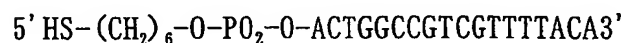
Si 基板 10 を試料保持台 20 に載せ、ゲートバルブ 24 を閉じた。真空排気装置 25 によって潜像室 21 内の圧力が 10^{-7} Torr 以下になるまで真空排気した。ガス導入口 22 より流量 10 s c c m の酸素を導入し、潜像室 21 内の圧力を 3×10^{-3} Torr にした。次に電子ビーム発生部 41 を動作させ、即ち電子銃 40 で電子を発生させ、電子光学系 42 で電子ビーム 43 を 2 k V に加速し、膜表面に直径 0.4 μ m のスポットサイズで収束させ、不図示の駆動装置によって試料保持台 20 を設置したステージを電子ビームシャッター（図示せず）と連動させ二次元的に移動させることによって、マスクを用いずに所望のパターンの潜像層を形成した。照射終了後ガスの供給を止め、潜像室 21 内の圧力が 10^{-7} Torr 以下になるまで真空排気した。潜像室 21 に窒素ガスを導入し大気圧に戻しゲートバルブ 24 を開け潜像層を形成した Si 基板を取り出した。後の工程は実施例 2 と同様に行い、基板上にプローブアレイが形成されているのを確認した。

実施例 4

実施例 3 と同様の方法で Si 基板上に金のパターンを形成した膜を作成した。作成したパターンは図 3 A 中の $L_1 = 50 \mu$ m、 $L_2 = 130 \mu$ m とした。

DNA 自動合成機を用いて以下の配列の一本鎖 DNA を合成した。配列番号 1 の一本鎖 DNA 末端には DNA 自動合成機での合成時にチオールモディファイア (Thiol-Modifier) (グレンリサーチ (Glen Research) 社製) を用いることによってチオール (SH) 基を導入した。続いて通常の脱保護を行い DNA を回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製した。

配列番号：1



引き続き、DNA 自動合成機を用いて配列番号 2 ~ 4 の一本鎖核酸を合成した。配列番号 2 ~ 4 の一本鎖核酸は、配列番号 1 を基本とし、1 塩基変化させ

たものを配列番号 2、3 塩基変化させたものを配列番号 3、そして 6 塩基変化させたものを配列番号 4 とした。また配列番号 1～4 の一本鎖 DNA 末端には DNA 自動合成機での合成時に Thiol-Modifier (Glen Research 社製) を用いることによってチオール (SH) 基を導入した。続いて通常の脱保護を行い DNA を回収し、高速液体クロマトグラフィーにて精製し、以下の実験に用いた。配列番号 2～4 の配列を以下に示す。

配列番号：2

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTTGTTTTACA3'

配列番号：3

10 5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGCTTTTTTTACA3'

配列番号：4

5' HS-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCATCTTGTTTACA3'

上記配列番号 1～4 の一本鎖 DNA を用いて、上記実施例 1 に記載した方法と同様の方法で 4 種類の吐出用液体を調製し、バブルジェットプリンタ用の 4 つのインクタンクに各々の液体を充填し、各々のインクタンクをバブルジェットヘッドに装着した。

次いでパターンニング基板上にスポッティングできるように、不図示の駆動装置によって基板を二次元的に移動させることによって、金薄膜上に 4 種のプローブをスポッティングしてプローブアレイを作成した。

20 配列番号 1 の DNA と相補的な塩基配列を有する一本鎖 DNA を DNA 自動合成機で合成し、5' 末端にローダミンを結合させて標識化一本鎖 DNA を得た。この標識化一本鎖 DNA を 1 M NaCl / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に最終濃度 1 μM となるように溶解し、得られたプローブアレイとハイブリダイゼーション反応を 3 時間行った。その後、プローブアレイを 1 M NaCl / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖 DNA を洗い流した。次に該プローブアレイの

25

各々のスポットを蛍光顕微鏡（ニコン（株）社製）で観察し、その蛍光量を、画像解析装置（商品名：ARGUS 50；浜松ホトニクス（株）社製）を接続し、ローダミンBに適するフィルターセットを装着した倒立型蛍光顕微鏡を用いて定量した

- 5 標識化一本鎖DNAと完全マッチである配列番号1のDNAプローブのスポットでは4600の蛍光量であるのに対し、1塩基のミスマッチ配列を有する配列番号2のDNAプローブのスポットでは、2800の蛍光量が得られた。また、3塩基ミスマッチを有する配列番号3のDNAプローブのスポットでは、2100と完全マッチの半分以下の蛍光量しか得られず、6塩基ミスマッチの
- 10 配列番号4のDNAでは蛍光は観測されなかった。以上の結果から、DNAアレイ基板上で完全相補性の一本鎖DNAを特異的に検出することができた。

実施例5

実施例2と同様に、図1に示した装置を用い、実施例1と同様の方法でSi基板上に複数の金の薄膜パターン電極を形成させた。

- 15 銀ペーストでリードを作成し、薄膜パターン電極のそれぞれに接続させた。

- 実施例4と同様に、配列番号1および4の一本鎖DNAを用いて、上記実施例に記載した方法と同様の方法で2種類の吐出用液体を調製し、バブルジェットプリンタ用の2つのインクタンクに各々の液体を充填し、各々のインクタンクをバブルジェットヘッドに装着した。次いで該プリンタに上記実施例1と同じ方法で作成した基板を装着し、該基板上に2種のDNAプローブ溶液の各々を、
- 20 それぞれ異なる位置の金薄膜パターン電極上にスポッティングし、プローブアレイを作成した。

- 配列番号1のDNAプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAをDNA自動合成機で合成し、3'-末端にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて（6-アミノヘキシル）dATPを導入し、さらにこの
- 25 アミノ基にグルタルアルデヒドを介してアミノアクリジンを結合した標識

化一本鎖DNAを得た。

この標識化一本鎖DNAを1 M NaCl / 50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に最終濃度1 μ Mとなるように溶解し、得られたプローブアレイとハイブリダイゼーション反応を3時間行った。反応終了後、核酸プローブに標識した
5 アミノアクリジンに由来する酸化還元電流を測定した。

その結果、配列番号1のDNAプローブが結合している電極において、特異的に異なる電流値を検出することができた。

産業上の利用可能性

10 本発明のプローブ担体、その作成方法、その評価方法、及びそれを用いた標的物質の検出方法によれば、平滑な面を形成し得る金薄膜上に官能基としてチオール基を有する一本鎖DNAプローブを反応させて硫黄原子を介した結合を形成することで、これらの間に強固な結合が形成され、担体に強固に結合した一本鎖DNAプローブを有するプローブ担体を提供することができた。また、本発
15 明で使用している金薄膜は極めて平坦性が高く、大気中でも酸化されにくく、非常に安定であるため、走査型プローブ顕微鏡等の原子分解能を有する顕微鏡で直接プローブの評価をすることが可能となった。

また、金をパターンニングして形成することで安定した複数のプローブを配したプローブアレイを作成することが可能となった。

請 求 の 範 囲

1. 111 方位の単結晶金を含有する薄膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖 DNA プローブが固定されていることを特徴とするプローブ担体。
- 5
2. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で 0.5nm 以下である請求項 1 記載のプローブ担体。
3. 前記担体と前記一本鎖 DNA プローブとを介する硫黄原子が、一本鎖 DNA プローブの官能基として形成されている請求項 1 記載のプローブ担体。
- 10
4. 前記一本鎖 DNA プローブ中に官能基としてチオール基を有する請求項 1 記載のプローブ担体。
5. 前記一本鎖 DNA プローブを前記担体に固定化する際に、該担体に該一本鎖 DNA プローブを付与する方法として、インクジェット法を用いる請求項 1 記載のプローブ担体。
- 15
6. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、該担体上に金の単結晶薄膜を形成する方法を用いる請求項 1 に記載のプローブ担体。
7. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜が、電極である請求項 1 に記載のプローブ担体。
- 20
8. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜が、電圧を印加可能に構成されている請求項 1 に記載のプローブ担体。
9. 111 方位の単結晶金を含有する薄膜が形成された担体上に硫黄原子を介して一本鎖 DNA プローブが固定されているプローブ担体の製造方法であって、
- 25
- 担体上に 111 方位の単結晶金を含有する薄膜を形成する工程と、
該薄膜上に一本鎖 DNA プローブを硫黄原子を介して固定化する工程と

を有することを特徴とするプローブ担体の作成方法。

10. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜の表面凹凸が $1\mu\text{m}$ 角内で 0.5nm 以下である請求項 9 記載の作成方法。

5 11. 前記担体と前記一本鎖 DNA プローブとを介する硫黄原子が、一本鎖 DNA プローブの官能基として形成されている請求項 9 記載の作成方法。

12. 前記一本鎖 DNA プローブを前記担体に固定化する際に、該担体に該一本鎖 DNA プローブを付与する方法として、インクジェット法を用いる請求項 9 記載の作成方法。

10 13. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜の作成方法として、担体を金錯体溶液に浸漬し、前記担体上に金の単結晶薄膜を形成する方法を用いる請求項 9 に記載の作成方法。

14. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜が、パターニングされた金の単結晶からなる膜である請求項 9 ～ 13 のいずれかに記載の作成方法。

15 15. 前記パターニング方法として、担体上に電子線またはイオンの照射処理を用いる請求項 14 に記載の作成方法。

16. 請求項 9 ～ 15 のいずれかに記載の方法で作成されたプローブ担体の形状を走査型プローブ顕微鏡で観察及び検査することを特徴とするプローブ担体の評価方法。

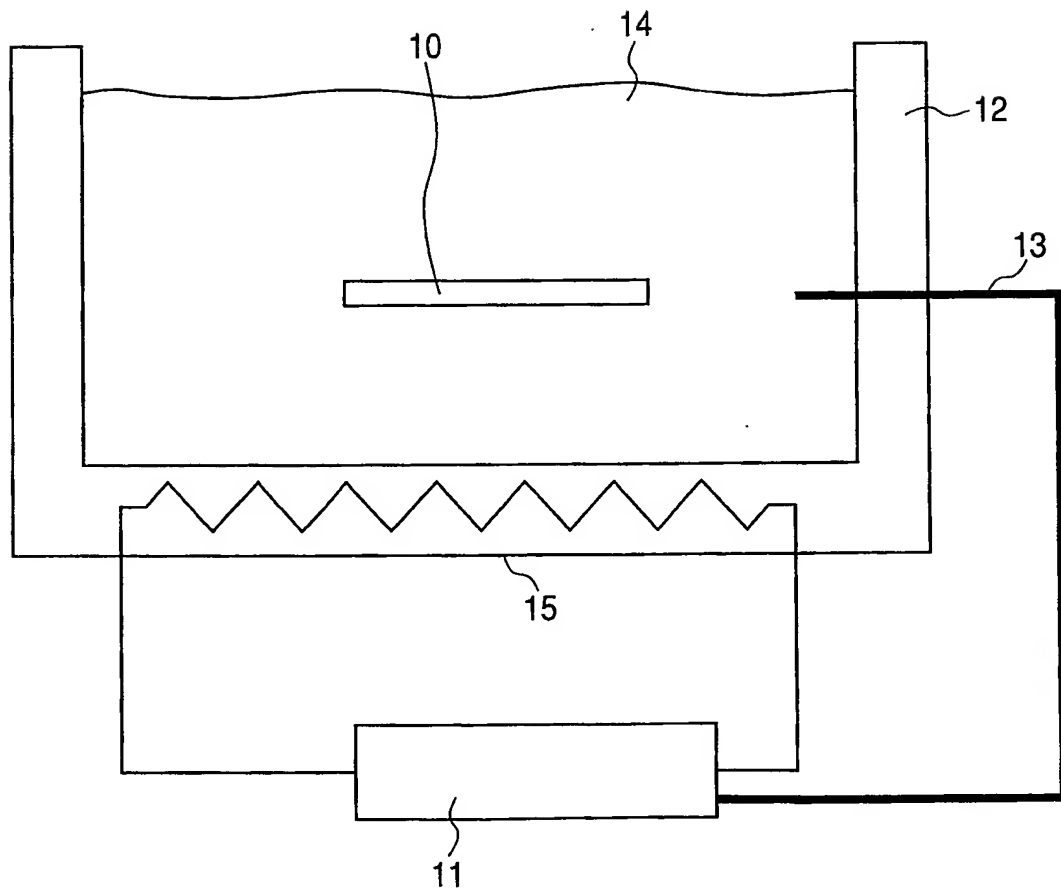
20 17. 標的核酸の検出のための一本鎖 DNA プローブを有するプローブ担体を用いた標的核酸の検出方法において、該プローブ担体が、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載されるプローブ担体であることを特徴とする標的核酸の検出方法。

25 18. 前記 111 方位の単結晶金を含有する薄膜を電極として構成し、該電極を用いた電気化学的な測定によって、標的核酸の検出を行う請求項 17 に記載の検出方法。

19. 111 方位の単結晶金を含有する薄膜を電極として構成し、該電極

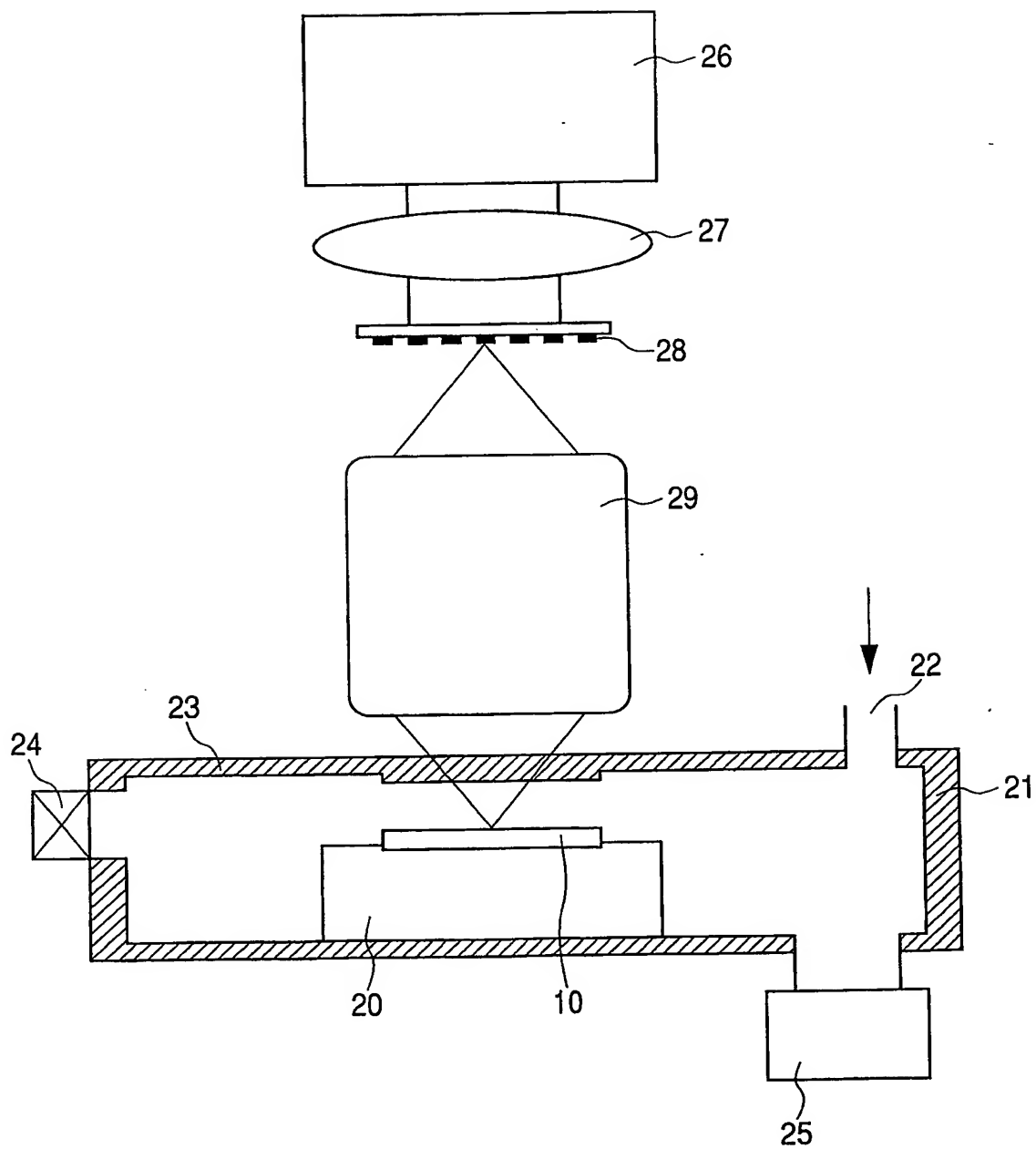
間をDNAに代表される分子鎖を用いて接続した分子デバイス。

1 / 4

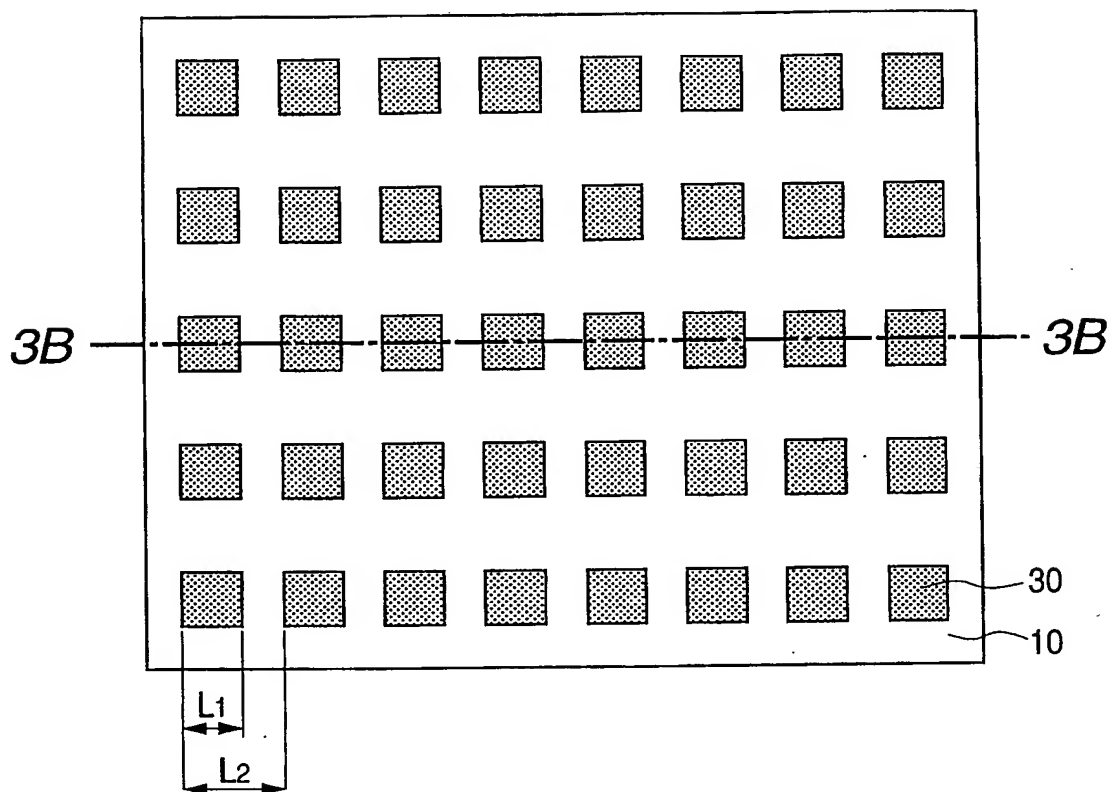
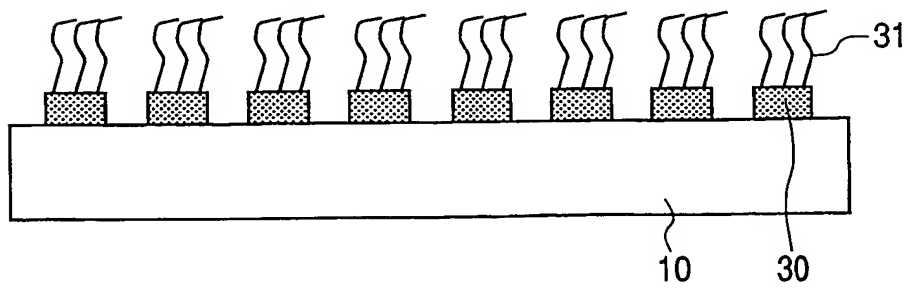
FIG. 1

2/4

FIG. 2

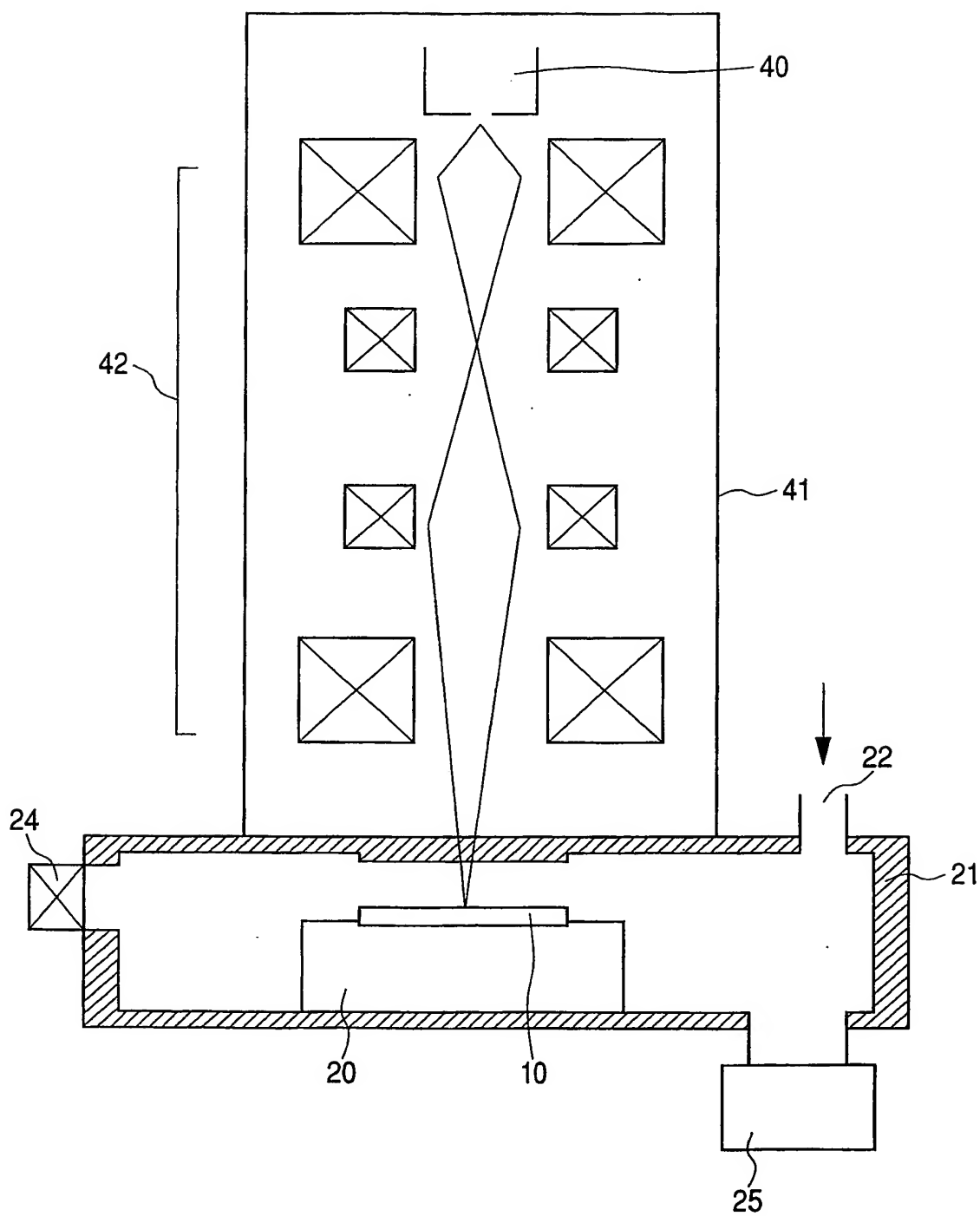


3 / 4

FIG. 3A*FIG. 3B*

4 / 4

FIG. 4



~~1/2~~

SEQUENCE LISTING

<110> CANON KABUSHIKI KAISYA

<120> Probe carrier, and preparation process and evaluation method thereof, and target nucleic acid detection method using same

<130> cfo17349

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe sequence for Hybridization test

<400> 1

actggccgtc gttttaca

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe sequence for Hybridization test

<400> 2

actggccgtt gttttaca

18

- 2/2

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe sequence for Hybridization test

<400> 3

actggccgct tttttaca

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Probe sequence for Hybridization test

<400> 4

actggcaatct tgtttaca

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, C12Q1/68, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, C12Q1/68, C12M1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-050931 A (Takatoshi MIYAHARA), 23 February, 2001 (23.02.01), (Family: none)	1-19
Y	JP 6-136551 A (Canon Inc.), 17 May, 1994 (17.05.94), (Family: none)	1-19
Y	JP 6-192841 A (Canon Inc.), 12 July, 1994 (12.07.94), (Family: none)	1-19
Y	JP 2002-65299 A (Canon Inc.), 05 March, 2002 (05.03.02), (Family: none)	5, 12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 September, 2003 (19.09.03)

Date of mailing of the international search report
07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' G01N33/53、C12Q1/68、C12M1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ' G01N33/53、C12Q1/68、C12M1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-050931 A (宮原孝俊) 2001. 02. 23 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP 6-136551 A (キャノン株式会社) 1994. 05. 17 (ファミリーなし)	1-19
Y	JP 6-192841 A (キャノン株式会社) 1994. 07. 12 (ファミリーなし)	1-19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

亀田 宏之

2 J

9015

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-65299 A (キャノン株式会社) 2002.03.05 (ファミリーなし)	5, 12